후두 편평세포병변에서 CD44v3의 발현 의의

조선대학교 의과대학 이비인후과학교실,[1] 병리학교실[2]
도남용[1] · 조성일[1] · 이준한[1] · 임태승[1] · 최성준[1] · 임성철[2]

The Significance of CD44v3 Expression in Squamous Cell Lesions of the Larynx

Nam Yong Do, MD[1], Sung Il Cho, MD[1], Jun Han Lee, MD[1],
Tae Seung Im, MD[1], Seong Jun Choi, MD[1] and Sung Chul Lim, MD[2]
[1]Department of Otorhinolaryngology and [2]Pathophysiology, College of Medicine, Chosun University, Gwangju, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : It is known that a part of laryngeal premalignant lesions progresses to an invasive carcinoma. Despite many previous reports, conventional histology is not sufficient to predict such tumor progression. Herein, the authors investigated the role of CD44v3 as a biomarker in predicting the progression of laryngeal premalignant lesion to an inavasive cancer. **Subjects and Method** : Paraffin-embedded tissue specimens from 40 patients were diagnosed accordingly as laryngeal invasive squamous cell carcinoma (n=10), Carcinoma *in situ* (n=10), dysplasia (n=10), and hyperkeratosis (n=10) between 1993 and 2002. They were immunohistochemically stained for CD44v3 protein. **Results** : In invasive squamous cell carcinoma, the expression of CD44v3 was diffused and gave a strong positive stain, and in carcinoma *in situ*, it was diffused and gave 3+ −2+ stain. However, in dysplasia and hyperkeratosis, the proportion of CD44v3 expression was decreased by 2+ −1+, and 1+ −0, respectively. **Conclusion** : These results suggest that the expression of CD44v3 in laryngeal premalignant and malignant lesions can be associated with tumorigenesis and invasion. Those strong positive expressions of CD44v3 may represent more aggressive pathology of the larynx. **(Korean J Otolaryngol 2005;48:357-61)**

KEY WORDS : Antigen, CD44 · Larynx , carcinoma · Squamous cell.

서 론

후두암은 이비인후과 영역에 발생하는 악성종양의 약 25% 정도를 차지하며, 대부분 편평세포암종이다. 정상적인 후두 편평세포가 암종으로 진행되는 과정은 과각화증, 이형성증, 상피내암, 그리고 침습암으로 단계적으로 진행된다고 알려져 있다. 정상 편평세포가 전구 병변을 거쳐 양성 및 악성 종양으로의 변화 과정에 종양 유전자나 종양 단백들의 변화가 동반될 것으로 알려져 있다.[1)]

종양의 진행과정 평가에 이용될 수 있는 새로운 표지자에 대한 지속적인 연구 결과의 하나로 CD44 당단백의 중요성이 제기되고 있다. 일반적 형태의 CD44s형은 히알루론산염(hyaluronate)의 수용체로 작용하여 혈구 세포와 상피세포 등에 널리 분포한다. 그러나 정상세포에서 관찰되지 않는 변형된 CD44v형은 유방암, 대장암, 위암, 악성 림프종 및 자궁경부암에서 발현이 증가한다고 알려져 있다.[2-4)] 특히 CD44v3는 glycosaminoglycan(GAG) 부착부위를 가지고 있어 다양한 GAG 결합 성장인자들과 결합하여 이러한 인자들의 발현을 유도한다.[5)] 또한 CD44v3형이 유방암 세포의 vascular endothelial growth factor(VEGF)와 결합하여 이 종양의 혈관형성을 증진시키고 종양세포의 증식에 기여한다고 여겨지고 있다.[6)] 이 분자는 종양세포의 이주에도 관계하여 전이와 나쁜 예후 인자로서의 가능성이 제기되고 있다.[7)]

본 연구에서는 암의 진행과 전이에 관련이 있다고 보고되고 있는 CD44v3를 사용하여 후두의 침습성 편평세포암종, 상피내암, 이형성증, 과각화증으로 진단된 환자의 조직을 면역조직화학적 방법으로 염색하여 이들의 발현정도 및 양상을 관찰하여 CD44v3가 종양의 형성 및 침습의 생물학적 표지자로서의 의의가 있는지 살펴보고자 하였다.

논문접수일 : 2004년 6월 28일 / 심사완료일 : 2004년 8월 31일
교신저자 : 임태승, 501 - 140 광주광역시 동구 서석동 588
조선대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (062) 220 - 3200 · 전송 : (062) 225 - 2702
E - mail : doctor119@chosun.ac.kr

대상 및 방법

연구재료

환 자

1993년부터 2002년까지 10년 동안 조선대학교 부속병원 이비인후과에서 조직검사로 확진된 후두의 침습성 편평세포암종(squamous cell carcinoma) 10예, 상피내 암종(carcinoma *in situ*) 10예, 이형성증(epithelial dysplasia) 10예, 과각화증(hyperkeratosis) 10예를 대상으로 하였다. 그리고, 정상대조군으로 특별한 조직학적 이상소견을 찾을 수 없는 정상 후두조직 5예를 대상으로 하였다.

시 약

면역 조직화학적 검사에 사용된 1차 항체는 NeoMarkers사(Fremont, CA, USA)의 mouse monoclonal antibody CD44v3(clone VFF-327v3)를 이용하였으며, 2차항체와 발색제는 각각 Dako사(Glostrup, Denmark)의 LSAB Kit와 AEC(3-amino-9-ethyl carbazole) kit를 이용하였다.

연구방법

병리과 조직 슬라이드 화일을 대상으로 후두의 병변을 재검토하여 종양의 침습여부 등을 재확인하고, 연구목적에 부합되는 대표적인 부위를 선택하였다. 관찰 대상이 된 조직들은 10% 중성 포르말린에 충분히 고정하여 파라핀 포매 하였으며 이를 4 μm 두께의 절편으로 제작하여 hematoxylin-eosin 이중 염색과 CD44v3에 대한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

면역조직화학적 검사

앞서 제작한 조직 절편을 슬라이드에 부착하여 xylene으로 탈파라핀한 뒤 무수 알코올, 90%, 75% 및 50% 에탄올에 각각 2분씩 처리하여 함수시킨 후 LSAB 방법에 의해 염색을 시행하였다. 항원성 회복을 위하여 citrate 완충액(10 mM, pH 6.0)에 슬라이드를 담가 전자오븐에 15분간 끓인 후 실온에 방치시켜 20분간 식힌 후 50 mM Tris 완충용액(TBS, pH 7.5)으로 세척하였다. 조직절편내의 내인성 과산화효소의 활성을 억제하기 위하여 0.3% hydrogen peroxide-methanol에 10분간 처리 후 증류수로 세척하고 차단항체를 실온에서 10분간 반응시킨 뒤 일차항체 CD44v3를 1시간 반응시켰다. Tris 완충액으로 세척하고 LSAB kits를 이용하여 비오틴이 함유된 이차 항체를 실온에서 10분간 반응시킨 후 Tris 완충액으로 세척하고, peroxidase가 결합된 streptavidin용액을 10분간 반응시켰다. Tris완충액으로 세척 후 AEC kit로 발색하였다. Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 하였다.

양성 대조군으로는 편도선조직을 이용하였으며, 음성 대조군으로는 일차항체 대신 Tris 완충액을 사용하였다.

면역조직화학적 염색의 판정

세포막을 따라 적갈색 과립염색을 양성으로 판정하였는데, 음성을 보이거나 10% 미만의 종양세포에서 약하게 염색되는 경우를 음성(0), 종양세포의 10% 이상에서 염색은 되었으나 세포막의 일부가 약하게 염색되는 경우는 약양성(1+), 종양세포의 10% 이상에서 세포막의 전체가 중등도로 염색되는 경우를 중등도양성(2+), 종양세포의 10% 이상에서 세포막 전체가 강하게 염색되는 경우를 강양성(3+)으로 판정하였다.

통계학적 분석

후두 편평세포병변에 따른 CD44v3의 발현 정도와의 관련성을 Fisher's exact test를 이용하여 검정하였고, $p<0.05$인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 간주 하였다.

결 과

후두 편평세포병변에서의 CD44v3 발현

후두 편평세포병변에 따른 CD44v3 발현을 보면 침습성 편평세포암종과 상피내 암종의 경우 100%에서 중등도양성(2+) 이상의 발현을 보이고 이형성증은 70%에서 중등도양성(2+)을 보였으나 과각화증은 70%에서 일부 제한된 세포에만 약양성(1+)발현을 보이고 대조군은 80%가 음성발현을 보여 후두 편평세포병변과 CD44v3 발현율은 통계적으로 유의한 차이를 보였으며 후두편평세포병변이 악성인 경우에 CD44v3 발현율이 통계적으로 유의하게 높았다($p<0.001$)(Table 1).

Table 1. Histological analysis of the laryngeal lesions of different stages by CD44v3 immunohistochemical staining

	CD44v3				P-value
	Negative	1+	2+	3+	
ISCC* (n=10)			1	9	p<0.001
Carcinoma in situ (n=10)			4	6	
Dysplasia (n=10)	1	2	7		
Hyperkeratosis (n=10)	3	7			
Control (n=5)	4	1			

*ISCC : invasive squamous cell carcinoma. Tested by Fisher's exact test

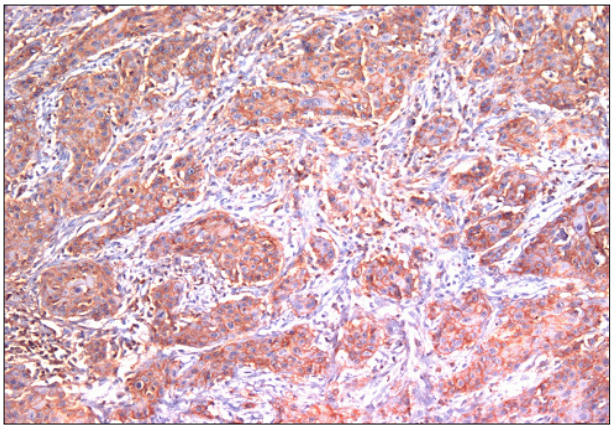

Fig. 1. Immunohistochemical staining for CD44v3 showing a strong positivity on the invasive squamous cell carcinoma of the larynx. Original magnification ×100.

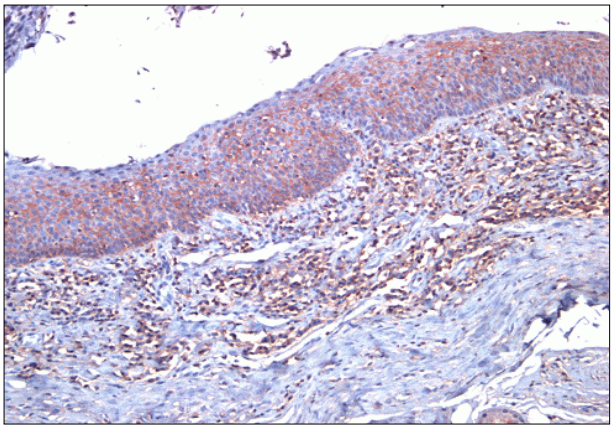

Fig. 2. Immunohistochemical staining for CD44v3 showing a moderate positivity on the severe dysplasia of the larynx. Original magnification ×100.

침습성 편평세포암종의 CD44v3 발현

모든 증례에서 미만성으로 양성반응을 보였는데 10예 중 9예에서 강양성(3+)발현을 보였고, 1예는 중등도양성(2+)발현을 보였다(Fig. 1).

상피내 암종의 CD44v3 발현

모든 증례에서 미만성으로 양성반응을 보였는데 6예에서 강양성(3+)발현을 보였고, 나머지 4예는 모두 중등도양성(2+)발현을 보였다.

이형성증의 CD44v3 발현

3예는 상피층 하부 1/3에 국한되어 중등도양성(2+)발현이 보였는데, 국소적으로는 강양성(3+)발현도 관찰되었다. 4예는 기저세포 및 기저세포 직상부 한두층에 국한되어 중등도양성(2+)발현이 관찰되었고, 2예는 기저세포층에 약양성(1+), 나머지 1예에서는 상피전층이 음성발현을 보였다(Fig. 2).

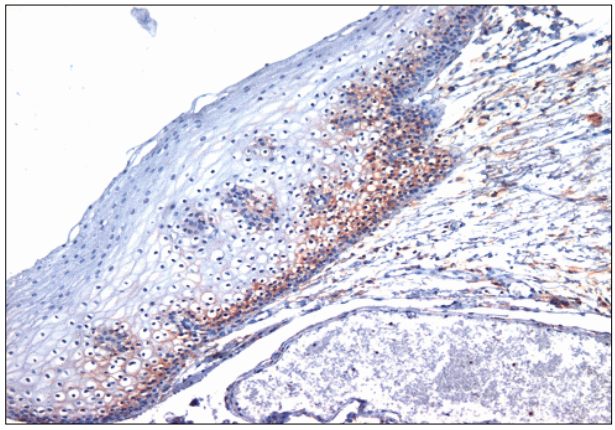

Fig. 3. Immunohistochemical staining for CD44v3 showing a weak positivity on the non-neoplastic acanthotic epithelium of the larynx. Original magnification ×100.

과각화증의 CD44v3 발현

7예는 기저세포층에 약양성(1+)발현이 관찰되었으나, 그 외의 상피층은 모두 음성이었다. 3예는 상피전층이 음성발현을 보였다(Fig. 3).

정상대조군의 CD44v3 발현

4예는 상피전층이 음성발현을 보였으며, 1예는 기저세포층에 약양성(1+)발현이 관찰되었으나, 그 외의 상피층은 모두 음성이었다.

고 찰

후두에 발생한 전암성 병변을 절제한 후에 어떤 병변에서 침습암으로 진행할 것인가에 대해서 예측하기에는 현재까지 어려움이 있어왔다. 진단 당시에 전암성 병변과 함께 이미 악성 병변이 일부 함께 있을 수 있고 경우에 따라 악성여부와 악성으로의 진행 여부 등을 예측할 수 없다. 따라서 임상적 종양의 진행에 대한 진단을 개선하고 악성병변으로의 진행에 좀 더 정확하고 객관적인 진단 방법이 필요하게 되었고 세포표면 부착수용체의 역할에 대하여 많은 연구들이 진행되었다. 이러한 세포표면 부착수용체로는 integrins, cadherins, selectins, immunoglobulin supergene family, CD44 등이 알려져 있다.[3)]

CD44 단백은 세포와 기질의 유착, 종양의 성장 및 전이, 림프구의 활성에 관여하는 인자로 다형태의 경막성 단백(multiform transmembrane protein)이다. CD44는 기저막의 hyaluronate에 세포를 고정시킴으로써 정상적인 상피 극성을 증진시킨다는 가설이 제기되고 있으나 CD44의 상피 변형(epithelial variant)의 역할은 잘 알려져 있지 않다.[8)] CD44는 11번 염색체의 단완에 위치하며 20개의 exon

으로 구성되어 있고 exon 6부터 exon 15사이의 exon이 교대성 접합(alternative splicing)에 의해 다양하게 재접합하고, 이들의 mRNA가 추가로 세포외 영역에 삽입되면 여러 종류의 아형(CD44 variants)이 만들어지고 다양한 구조와 기능을 갖게 된다.[9-12] 최근에 CD44가 세포외 기질과의 상호작용에 의하여 종양의 전이에 중요한 역할을 한다는 연구결과가 보고된 바 있다. Gunthert 등[13]은 흰쥐의 췌장과 유방의 암세포가 전이성 표현형(metastatic phenotype)을 나타내기 위해서는 고농도의 CD44 isoform이 필요하다고 주장하였으며 비호지킨 림프종에서 CD44의 과발현은 광범위한 전이 및 불량한 예후와 관련있다는 보고도 있다. Brich 등[14]은 사람의 악성흑색종 세포계에서 CD44s 발현이 낮은 군과 높은 군을 분리하여, 이 두군에서 세포의 이동력, 부착, hyaluronate와 부착력, 그리고 전이병소의 형성능력에 차이가 있음을 발견하고, CD44s가 종양의 진행과 전이에 직접적인 원인일 것으로 추정하였다. Joensuu 등[15]은 유방암에서 CD44의 면역조직화학적 염색 결과 CD44 발현은 다수의 핵분열 및 저분화와 같은 악성도가 높은 조직학적 소견과 관련있다고 보고하였다. 이러한 연구들과 같이 CD44의 발현은 종양의 전이 및 악성도와 밀접한 관계가 있고 CD44가 인체에 발생하는 종양의 예후인자로서 이용될 수 있음을 시사하고 있다.

CD44v3는 아직까지 후두 편평세포암에서는 연구가 부족하며 논쟁의 여지가 남아 있다. Oliveira 등[16]은 CD44v3의 발현이 저하되어 있거나 없었을 때 종양의 진행이 증가된다고 보고하였고, Seelentag 등[17]의 인체 표피에 발생한 편평세포암에서의 연구에서도 유사한 결과를 보고하였다. 그러나 Elizabeth 등[18]의 연구에서 CD44v3가 heparin binding epidermal growth factor(HB-EGF), keratinocyte autocrine growth factor 등의 성장 인자들에 대한 수용체를 가져 종양의 전이와 진행에 관여한다고 보고 하였으며 본 연구에서도 침습성 편평세포암의 9예에서 강양성(3+) 발현을 보였고, 1예는 중등도양성(2+)발현을 보이는 등 모든 증례에서 미만성으로 양성반응을 보였다. 이와같이 연구자에 따라 상이한 CD44v3 단백 발현을 보이는 이유를 생각해보면 연구대상이 되는 검체의 실제적 차이 및 염색방법의 차이 등을 고려해 볼 수 있다. 이외에도 염색결과의 해석차이가 있을 수 있는데 Kim 등[19] 본 연구와 같이 종양세포의 10% 이상에서 발현된 경우를 양성으로 판정하였으나, 다른 연구자들[20]은 이와 유사한 연구에서 양성으로 판정한 기준을 제시하지 않아 연구결과 비교분석이 용이하지 않았다. 통계학적 분석상 침습성 편평세포암종과 상피내 암종의 경우 100%에서 중등도양성(2+)이상의 발현을 보였고, 이형성증은 70%에서 중등도양성(2+) 발현을 보였으나 과각화증은 70%에서 약양성(1+), 30%에서 음성발현을 보여 통계학적으로 유의한 차이를 보였다. 이러한 결과로서 CD44v3는 종양의 형성초기에 이형성이 초래될 때부터 관여하여 이형성의 정도가 더욱 진행되고, 상피내암 과정을 거쳐 기저막을 뚫고 종양세포가 기질로 침습성장하는 단계로 진행하는데 관여하는 것으로 여겨져 종양의 형성, 진행 및 침습성 성장에 중요한 역할을 하는 것으로 생각할 수 있다.

따라서 후두의 전암병변 진행을 예측하는데 지표가 되는 정확한 기준의 하나로 또한, 생물학적 표시인자의 하나로서 CD44v3가 후두 편평세포 암종의 조기진단 및 치료결정에 도움이 되는 특이적인 분자생물학적 인자가 될 수 있을 것으로 추정된다.

결 론

CD44v3는 종양의 형성 및 침습에 중요한 역할을 담당하는 것으로 사료되며, 후두종양이 의심되어 생검된 조직이 분화정도가 좋거나, 대표적인 종양 부위의 선택이 이루어지지 않아 정확한 진단이 곤란한 경우 CD44v3에 대한 면역조직화학적 염색을 실시하여 CD44v3가 상피전층에 걸쳐 미만성으로 중등도(2+) 이상의 양성발현을 보일 경우 편평상피암종을 의심할 수 있으며, 미만성으로 강양성(3+)발현을 보일 경우 내시경 생검상 침습부위를 확인하지 못하더라도 침습가능성을 배제하기 위한 노력을 하는 것이 타당하리라 사료된다.

중심 단어 : CD44 · 후두 · 편평세포병변.

본 연구는 2003년 조선대학교 교내 학술 연구비의 지원에 의한 것임.

REFERENCES

1) Crissman JD, Zarbo RJ. *Dysplasia, in situ carcinoma, and progression to invasive squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. Am J Surg Patho 1989;13:5-16.*
2) Wielenga VJ, Heider KH, Offerhaus GJ, Adolf GR, van den Berg FM, Ponta H, *et al. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. Cancer Res 1993;53:4654-6.*
3) Kainz C, Kohlberger P, Sliutz G, Temfer C. Heinzl H, Reinthaller A, *et al. Splice variants of CD44 in human cervical cancer stage IB to IIB. Gynecol Oncol 1995;57:383-7.*
4) Kaufmann M, Heider KH, Sinn HP, von Minckwitz G, Ponta H, Herrlich P. *CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival. Lancet 1995;345:615-9.*
5) Bennett KL, Jackson DG, Simon JC, Tanczos E, Peach R, Modrell B, *et al. CD44 isoforms containing exon v3 are responsible for the*

presentation of heparin binding growth factor. J Cell Biol 1995;128: 687-98.

6) Kalish ED, Iida N, Moffat FL, Bourguignon LY. *A new CD44v3-containing isoform is involved in tumor cell growth and migration during human breast carcinoma progression. Front Biosci 1999;4:1-8.*

7) Jackson DG, Bell JI, Dickinson R, Timans J, Shields J, Whittle N. *Proteoglycan forms of the lymphocyte homing receptor CD44 are alternatively spliced variants containing the v3 exon. J Cell Biol 1995; 128:673-85.*

8) Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. *CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. Cell 1990;61: 1303-13.*

9) Seelantag WK, Boni R, Gunther U, Futo E, Burg G, Heitz PU, *et al. Expression of CD 44 isoforms and β1, 6-branched oligosaccharides in human malignant melanoma is correlated with tumor progression but not with metastatic potential. J Cutan Pathol 1997;24:206-11.*

10) Spafford MF, Koeppe J, Pan Z, Archer PG, Meyers AD, Franklin WA. *Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6, and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1996;122:627-32.*

11) Seiter S, Schadendorf D, Herrmann K, Schneider M, Rosel M, Arch R, *et al. Expression of CD44 variant isoforms in malignant melanoma. Clin Cancer Res 1996;2:447-56.*

12) Herold-mende C, Seiter S, Born AI, Patzelt E, Schupp M, Zoller J, *et al. Expression of CD44 splice variants in squamous epithelia and squamous cell carcinoma of the head and neck. J Pathol 1996;179: 66-73.*

13) Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Rudy W, Reber S, Zoller M, *et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. Cell 1991;65:13-24.*

14) Brich M, Mitchell S, Hart IR. *Isolation and characterization of human melanoma cell variants expressing high and low levels of CD44. Cancer Res 1991;51:6660-7.*

15) Joensuu H, Klemi P, Toikkanen S, Jalkanen S. *Glycoprotein CD44 expression and its association with survival in breast cancer. Am J Pathol 1993;143:867-74.*

16) Oliveira DT, Sherriff M, Odell EW. *Expression of CD44 variant exons by primary and metastatic oral squamous carcinomas. J Oral Pathol Med 1998;27:303-7.*

17) Seelentag WK, Gunthert U, Saremaslani P, Futo E, Pfaltz M, Heitz PU, *et al. CD44 standard and variant isoform expression in human epidermal skin tumors is not correlated with tumor aggressiveness but down-regulated during proliferation and tumor de-differentiation. Int J Cancer 1996;69:218-24.*

18) Elizabeth FJ, Weed DT, Civantos FJ, Goodwin WJ, Bourguignon LY. *A novel CD44v3 isoform is involved in head and neck squamous cell carcinoma. Otolaryngol Head Neck Surg 2001;124:426-32.*

19) Kim JK, Lee CH, Lee KM, Song JM. *Clinicopathologic significance of CD44s, CD44v5, CD44v6 expression in non small cell lung carcinoma.J Korean Pathol 2004;38:93-9.*

20) Harn HJ, Ho LI, Chang JY. *Differential expression of the human metastasis adhesion molecule CD44v in normal and carcinomatous stomach mucosa of chinese subjects. Caner 1995;75:1065-71.*